

Új kinázgátló vegyületek kombinációs rákterápiához

Doktori tézisek

Gyulavári Pál

Semmelweis Egyetem
Gyógyszertudományok Doktori Iskola



Témavezető:

Vántus Tibor Ph.D. tud. főmunkatárs

Hivatalos bírálók:

Tábi Tamás Ph.D. docens

Wunderlich Lívius Ph.D. adjunktus

Szigorlati bizottság elnöke:

Tretter László D.Sc. egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Balla András Ph.D. docens

Micsónai András Ph.D. tanársegéd

Budapest

2019

1. Bevezetés

A különféle rákos elfajulások korunk legmagasabb morbiditású betegségei közé tartoznak. Közös jellemzőjük a sejtek korlátlan osztódása. Súlyos problémává -rosszindulatúvá- akkor válnak, mikor a ráksejtek kiszakadnak szöveti környezetükből és ún. áttéteket képeznek más szervek szöveteiben. Az áttétes szervek funkciója romlik, ami végül a beteg halálát okozza. A rákos elfajulások sok szempontból heterogének, de az elmúlt harminc évben világossá vált, hogy ezek közül a legfontosabb genetikai sokféleségük. Ma már ismert, hogy a különféle genetikai elváltozások és az általuk eredményezett hibás működésű fehérjék irányítják a ráksejtek szüntelen osztódását. Genetikai elváltozások számos külső és belső hatásra keletkezhetnek, de az egészséges sejtek hibajavító mechanizmusai korrigálják őket. Kritikus számú és minőségű hiba megmaradása azonban rákossá teszi a sejtet. A humán genom fehérjét kódoló génjei közül meglepően kevésnek a hibája (mintegy 140) játszik döntő szerepet a rákok túlnyomó többségében. E megváltozott gének és fehérjék az úgynevezett „driver”-ek.

A driver gének között meglepően nagy számban találjuk kinázok génjeit. A kinázok olyan enzimfehérjék, melyek egy foszfo-csoportot (PO_3) képesek áthelyezni más makromolekulákra és így azok működését befolyásolni. Sorban egymást foszforiláló kinázok alkotják a sejtek legjelentősebb intracelluláris jelpályáit, melyek a sejtfunciókat -köztük a sejtosztódást- szabályozzák. Más kinázok közvetlenül a sejtfunciókat végző makromolekulákat irányítják. Ez utóbbira példák az Auróra kinázok.

Az Auróra kinázok minden emberi sejt osztódásának vezérlésében kulcsszerepet játszanak. Három paralóg fehérje tartozik a családba, amelyek közül a két legfontosabb az „A” és „B” jelű kináz. Az Auróra A a sejt mikrotubulus vázrendszerének központjául szolgáló centroszóma osztódásáért és a belőle kiinduló mikrotubulus orsók felépüléséért felel. Az Auróra B kináznak három funkciója is van: 1) a

sejtosztódás előtt megkettőződött DNS állomány kromoszómákba kondenzálódását, 2) a korrekt mikrotubulus orsó-kromoszóma kapcsolatok kiépülését és 3) magát az utódsejtek fizikai szétválását, a citokinézist vezényli le.

Az Auróra kinázok hibás (alul, vagy túl) működése a kromoszómák - és így a gének- egyenlőtlen eloszlását vonja maga után az utódsejtekben. Így az Auróra kinázok hibás működése aktívan hozzájárul a genetikai elváltozások gyarapodásához a ráksejtekben. Bár jelen ismereteink szerint egyik Auróra kináz sem driver, számos ráktípusban tapasztalható hibás működésük. Ezen kívül a sejtosztódásban (ami ahogy az imént láttuk, a ráksejtek legalapvetőbb tulajdonsága) betöltött központi szabályzó szerepük és a tény, hogy gyógyszerhatóanyagokkal gátlható működésük mégis ígéretes terápiás célpontokká teszi őket. Sok laboratóriumi eredmény támasztja alá, hogy az Auróra kinázok gátlása valóban sejthalált -apoptózist- indukál ráksejtekben. Ugyanakkor máig nem egyértelmű, hogy melyik paralóg, az Auróra A vagy B a jobb célpont, esetleg mindkettő gátlása szükséges a maximális rákellenes hatás eléréséhez.

Az elmúlt másfél évtizedben több tucat célzottan Auróra kinázgátló hatóanyagot fejlesztettek ki, de egy kivételével mind elbukott a klinikai vizsgálatok során. Jelenleg sincs Auróra kinázgátló alapú engedélyezett gyógyszer a piacon.

Sajnos az ismert driver fehérjék ellen általában is kevés célzott hatóanyag áll az onkológusok rendelkezésére. Ráadásul a ráksejtekben az új genetikai elváltozások is gyorsabban halmozódnak fel (például az Auróra kinázok hibás működésének hatására), ezért rezisztencia is gyorsabban alakul ki a gyógyszerekkel szemben. Az egyik lehetséges kiutat a már meglévő hatóanyagok kombinálása jelentheti, ami szerencsés esetekben szinergisztikus. Szinergizmus akkor áll fenn, ha egy hatóanyag kombináció hatékonyabb, mint az egyes hatóanyagok külön-külön mért hatásának az összege.

2. Célkitűzések

Habár az Auróra kinázok ígéretes gyógyszer-célpontok, jelenleg még sincs engedélyezett gátló szerük. Éppen ezért doktori munkám témájaként az Auróra kinázgátlók vizsgálatát választottuk. A Vichem Kft. molekulatárjában korábban azonosítottak egy benzotiofén-3-karboxamid alapvázú kismolekula családot, amelyek jól gátolták az Auróra kinázokat. Doktori munkám során két feladatot tűztem ki célul:

I) A benzotiofén-3-karboxamid analógok részletes vizsgálatát számos *in vitro* és sejtes kísérleti rendszerben. Az Auróra kinázgátló hatás bizonyítását és a leghatékonyabb, vezérmolekula kiválasztását.

II) A vezérmolekula vizsgálatát hatóanyag-kombinációs kísérletekben.

3. Anyagok és módszerek

Sejtvonalak

Munkámhoz az ATCC-ből származó HCT 116 és HT-29 humán vastagbélrák sejtvonalakat használtam melyeket a forgalmazó által ajánlott (10% (V/V) magzati borjú savóval és antibiotikummal kiegészített) sejtenyésztő médiumban neveltem párásított, 5% CO₂-t tartalmazó atmoszférájú inkubátorban az előírásoknak megfelelően.

Gátlókerek és rekombináns enzimek

A kísérletekhez használt benzotiofén-3-karboxamid alapú hatóanyagokat a Vichem Kft-ben szintetizálták. A referencia Auróra gátlóként használt VX-680, MLN8054 és MLN8237 hatóanyagokat a Selleck Chemicals-tól (LLC, USA) illetve a Sigma-Aldrich-től vásároltuk. Minden hatóanyagot 5 mM-os DMSO törzsoldatban tároltunk és tisztaságukat háromhavonta HPLC-vel ellenőriztük.

A rekombináns Auróra A enzim a Proteros Biostructures-től, az Auróra B a SignalChem-től (lot: E021-1) származott.

Sejt életképesség mérés

A ráksejtek életképességét a gátlókerek jelenlétében klasszikus MTT módszerrel mértem meg 96 lukú lemezeken. A kezelt kultúrákról minden médiumot eltávolítottam és 50 µl, 2 mg/ml koncentrációjú MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium bromid) oldattal 1,5 órán át 37°C-on inkubáltam őket. A formazán kristályokat szolubilizáltam (2-propanol, 1 mM HCl és 10% (V/V) Triton X-100), majd megmértem az oldat abszorpcióját két hullámhosszon. A 635 nm-es adatokat (referencia hullámhossz) kivontam az 570 nm-es adatokból. Az így nyert nyers adatokból a kontrollokhoz viszonyított IC₅₀ értékeket Excel (Microsoft) és XLfit 5.1.0 (IDBS, Surrey, UK) szoftverekkel határoztam meg.

In vitro rekombináns enzimgátlás mérés

A vásárolt rekombináns enzimekkel optimalizált összetételű pufferben futtattam a reakciókat 384 lukú lemezekben (Corning 3676). Az ATP koncentrációt külön kísérletben mindkét kináznak a saját $K_{M[ATP]}$ értékére állítottuk be. Az enzimreakció működését IMAP (Molecular Devices) rendszerrel detektáltuk. A nyers adatokból a kontrollokhöz viszonyított IC_{50} értékeket Excel (Microsoft) és XLfit 5.1.0 (IDBS, Surrey, UK) szoftverekkel határoztam meg.

Áramlási citometriás mérés

A 24 lukú lemezen kezelt sejtkultúrákat minden felülúszóval és mosó oldattal együtt mintatartó csövekbe mértem és propídium-jodiddal (a DNS tartalom vizsgálata esetén) vagy propídium-jodid és Annexin V-FLUOS kombinációjával (az apoptózis vizsgálat esetén) jelöltem. A jelölt minták fluoreszcenciáját FACSCalibur áramlási citométerrel és CellQuest Pro szoftverrel (BD Biosciences) mértem meg. A kiértékelés szintén CellQuest Pro illetve Excel (Microsoft) programokkal történt.

Western blot analízis

A 60 mm-es petri csészéken nevelt és kezelt sejtkultúrákat jéghideg RIPA pufferrel (50 mM Tris pH 7,4, 150 mM NaCl, 1% (V/V) NP-40, 0,5% (V/V) nátrium-deoxikolat, 0,1% (V/V) SDS, 2 mM EDTA, 2 mM EGTA, 1 mM DTT, 1 mM nátrium-ortovanadát, 200 μ M PMSF és 0,5% (V/V) proteáz inhibitor koktél (Calbiochem)) lizáltuk. A mintákat a szokott módon előkészítettük és futtattuk 10%-os SDS-gélen, PVDF membránra blottoltuk és ellenanyagokkal inkubáltuk (1° -éjszakán át, 4°C / HRP-konjugált 2° -egy óra, szobahőmérséklet). Az ellenanyagokat a CellSignaling Technologies-tól (Danvers, MA, USA) és a Sigma-Aldrich-től (St. Louis, MO, USA) vásároltuk. Az ellenanyagokkal jelölt fehérjéket röntgenfilmen (CL-XPosure Films, Thermo Scientific, MA, USA) vizualizáltuk kemilumineszcens oldat segítségével (Western Lightning Plus-ECL, PerkinElmer).

Fluoreszcens mikroszkópia

A 96 lukú Ibidi μ -lemezen (89626) nevelt és kezelt sejt kultúrákat 4%-os (V/V) formalin oldattal fixáltam (10 perc, szobahőmérséklet), 0,1%-os Triton X-100 detergenssel permeabilizáltam (10 perc, szobahőmérséklet), majd ellenanyagokkal inkubáltam (1° -éjszakán át, 4°C / fluoreszcens festékekkel konjugált 2° -egy óra, szobahőmérséklet). Ezután a sejtmagokat 1 μ g/ml végkoncentrációjú DAPI oldattal (10 perc, szobahőmérséklet) festettem és a mintákat Zeiss Axiovert 200M fluoreszcens mikroszkóppal, AxioVision 3.1 szoftver segítségével vizsgáltam meg. Az egyes fluoreszcens festésekről készült képekből FIJI szoftverrel készítettem kompozit képet.

Hatóanyag kombinációs kísérletek

Minden kombináció esetén a hatóanyagok 1:1 arányú keverékéből (illetve monoterápiában a két hatóanyagból külön-külön) készítettem tíz tagú, harmadoló hígítási sort, amivel a 96 lukú lemezre kihelyezett sejt kultúrákat kezeltem. A sejt életképesség mérés a fent ismertetett MTT módszerrel történt.

A nyers adatokat 0 és 1 közé normáltam, majd CompuSyn® v1.0 szoftverrel (ComboSyn Inc.) analizáltam. A program a kezelések IC_{50} értéknél vett kombinációs indexét (CI) adja eredményül, ami $CI > 1$ érték esetén antagonizmust, $CI = 1$ esetén additív hatást, $CI < 1$ érték esetén szinergizmust jelez.

Statisztikai analízis

A feltüntetett adatok kevés kivétellel legalább három független mérés átlagai.

Minden rekombináns enzimgátlás mérés esetén kiszámoltuk a Z' értéket: $Z' = 1 - ((3SD_{\max} + 3SD_{\min}) / (AV_{\max} - AV_{\min}))$ ahol is az SD szórást, az AV átlagot jelöl. Csak azoknak az enzimgátlás-méréseknek az adatait fogadtuk el, amelyeknek a Z' értéke 0,5-nél nagyobb volt.

Az apoptózis vizsgálat esetén kétmintás t -próbával határoztam meg a minták különbségének szignifikanciáját ($p < 0,05$).

4. Eredmények

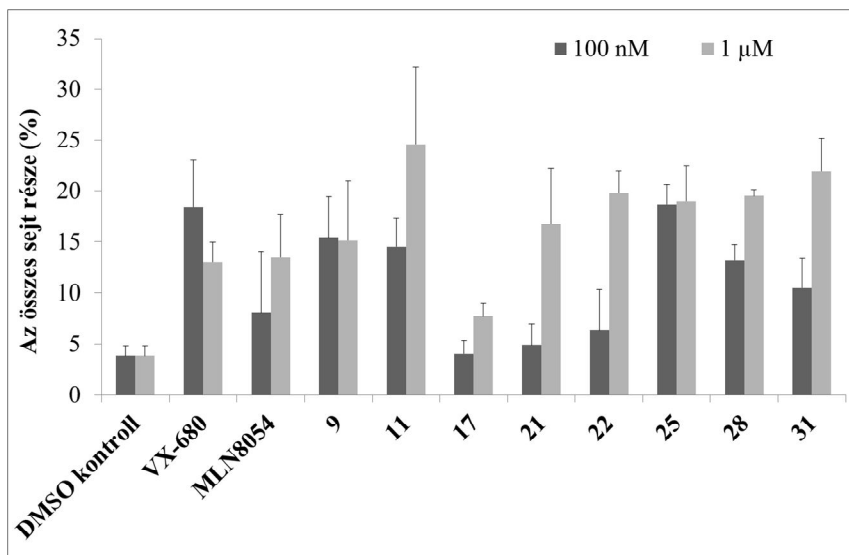
A Vichem Kft. molekulatárjában azonosított benzotiofén-3-karboxamid alapvázú kismolekulák közül 84-nek vizsgáltam meg az életképességre gyakorolt hatását HCT 116 sejteken. A 84 molekula között igen kis szerkezetbeli különbségek voltak, ami egyértelmű, szép szerkezet-hatás összefüggések felállítását tette lehetővé. Több molekula is a referencia Auróra kinázgátlókkal megegyező erősségben gátolta a sejtek életképességét, ezek közül a nyolc legjobbat vizsgáltam tovább. A vastagbélrák eredetű HCT 116 sejtekkel ellentétben e nyolc kiválasztott hatóanyag nem gátolta számottevően a primer humán fibroblaszt sejt kultúrák életképességét.

Az *in vitro* rekombináns enzimgátlás mérésben a nyolc kiválasztott hatóanyag mindegyike a referencia Auróra kinázgátlókkal hasonló erősségben gátolta az Auróra A és B kinázok működését. Számottevő különbséget viszont nem tapasztaltam az egyes anyagok hatása között.

Az Auróra B gátlásának biztos jele a citokinézis elmaradása és a sokmagvú (azaz emelkedett DNS tartalmú) sejtek megjelenése a kultúrában. Ezt elméletileg mind a nyolc kiválasztott hatóanyagnak el kellett volna érnie. Az áramlási citométeres mérésben viszont csak öt hatóanyag gátolta 100 nM koncentrációban 24 óra után a citokinézist (hasonlóan az Auróra A és B kettősgátló VX-680 referenciaanyaghoz), a másik három csak 1 μ M koncentrációban (hasonlóan az Auróra A szelektív MLN8054 referenciaanyaghoz).

Ugyanezt a mintázatot tapasztaltam fluoreszcens mikroszkópos felvételeken a sejtmagok sokszorozódását figyelve 100 nM és 1 μ M koncentrációban, 24 óra után.

Mi több, a nyolc kiválasztott hatóanyag közül ugyanaz az öt indukált apoptózist 100 nM koncentrációban, amelyek gátolták a citokinézist és sokmagvú sejteket hoztak létre. Ugyanakkor 1 μ M koncentrációban már mindegyik vizsgált anyag indukált apoptózist (1. Ábra). Megjegyzendő, hogy az apoptózis megjelenéséhez a 24 vagy 48 órás kezelés nem volt elég, az csak 72 óra után indukálódott a sokmagvú sejtekben.



1. Ábra Oldószer (DMSO) kontroll, referencia Auróra kinázgátlók és a nyolc kiválasztott benzotiofén-3-karboxamid által indukált apoptotizáló sejtek aránya két koncentrációban, 72 óra kezelés után.

A sejt életképesség és az apoptózis indukció vizsgálat alapján a nyolc kiválasztott hatóanyag közül a **25**-öst neveztem ki vezérmolekulának (2. Ábra). A **25**-ös már 100 nM-ban is indukált apoptózist, míg a **21**-es csak 1 μM koncentrációban. E két hatóanyag esetén végül western blot kísérletben is megvizsgáltam, hogyan befolyásolják az Auróra A és B kinázok működését élő sejtekben. Míg a **21**-es az Auróra A foszforilációját (és így aktivitását) már 500 nM koncentrációban gátolta, az Auróra B-ét még 1 μM koncentrációban is csak részlegesen. Ezzel szemben a **25**-ös -egybecsengve az áramlási citométeres mérésekkel- már 100 nM koncentrációban is gátolta mindkét Auróra kináz foszforilációját.

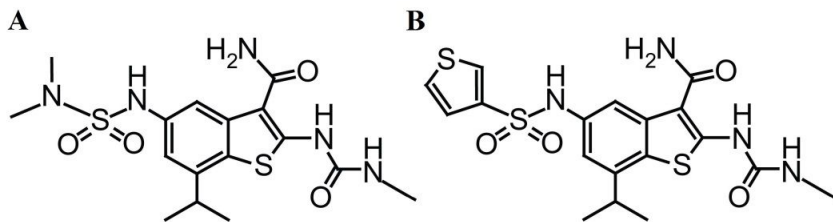
Végül második célomként megvizsgáltam a **25**-ös (és referencia Auróra kinázgátlóként a VX-680) hatását más célzott terápiás hatóanyagokkal kombinációban. Ezek közül hat hatóanyag típusról már kimutatták, hogy szinergizál Auróra kinázgátlókkal:

- GSK2126458, egy PI3K/mTOR gátló
- Erlotinib, egy EGFR gátló
- Trichostatin A, egy I-es és II-es típusú hiszton deacetyláz gátló
- Dasatinib, egy BCR/Abl és Src-család gátló
- Lonafarnib, egy farnezil-transzferáz gátló
- Carfilzomib, egy proteaszóma gátló

További két hatóanyagról nem állt rendelkezésre irodalmi adat:

- Crizotinib, egy ALK, ROS1 és c-Met gátló
- És természetesen a **34**-es jelzésű, saját fejlesztésű EGFR–c-Met kettősgátló

A **25**-ös a kombinációk zömében a VX-680-as referencia Auróra kinázgátlóval megegyező módon szinergizált a többi célzott hatóanyaggal. Mind a két Auróra kinázgátló mutatott szinergizmust továbbá a két c-Met gátló hatóanyaggal is.



2. Ábra A **21**-es (A) és **25**-ös (B) vegyületek kémiai szerkezete.

5. Következtetések

- A benzotiofén-3-karboxamid alapváz megfelelő alapot képez további Auróra kinázgátlók fejlesztéséhez. Több benzotiofén-3-karboxamid a referencia anyagokkal megegyező erősségben képes gátolni az Auróra A és B kinázok működését *in vitro* méréseben, továbbá csökkenteni humán vastagbél ráksejtek életképességét apoptózis indukálása révén.
- Az Auróra B kináz gátlása és a folyamányaként jelentkező citokinézis gátlás és sokmagvúság szükséges és elégséges volt a HCT 116 sejtek apoptózisának indukálásához. Az Auróra A-ra szelektív hatóanyagok csak magasabb koncentrációban okoztak apoptózist, amikor már az Auróra B kinázt is gátolták.
- A **25-ös** vegyület egy teljesen új hatóanyag, amely a Vichem Kft. benzotiofén-3-karboxamidjai közül a legerősebb Auróra kinázgátló hatással bír, ezért ezt választottam vezérmolekulának.
- A **25-ös** vegyület egyéb célzott hatóanyagokkal való kombinációban is Auróra kinázgátlóként viselkedett. Elsőként mutattam ki, hogy egy Auróra és egy c-Met kinázgátló együttes alkalmazása szinergisztikus lehet bizonyos körülmények között.

6. Saját publikációk jegyzéke

A disszertáció alapjául szolgáló publikációk:

1. Pál Gyulavári, Bálint Szokol, István Szabadkai, Diána Brauswetter, Péter Bánhegyi, Attila Varga, Péter Markó, Sándor Boros, Eszter Illyés, Csaba Szántai-Kis, Marcell Krekó, Zsófia Czudor, László Örfi (2018) Discovery and optimization of novel benzothiophene-3-carboxamides as highly potent inhibitors of Aurora kinases A and B. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 28(19), 3265-3270. DOI: 10.1016/j.bmcl.2018.05.064.
IF: 2,442
2. Bálint Szokol, Pál Gyulavári, Ibolya Kurkó, Ferenc Baska, Csaba Szántai-Kis, Zoltán Greff, Zoltán Örfi, István Peták, Kinga Péntes, Robert Torka, Axel Ullrich, László Örfi, Tibor Vántus and György Kéri (2014) Discovery and biological evaluation of novel dual EGFR/c-Met inhibitors. *ACS Medicinal Chemistry Letter* 5(4), 298-303.
DOI: 0.1021/ml4003309
IF: 3,120
3. Bálint Szokol, Pál Gyulavári, Ferenc Baska, Ibolya Kurkó, Zoltán Greff, Csaba Szántai-Kis, Zoltán Örfi, István Peták, Axel Ullrich, Tibor Vántus, György Kéri and László Örfi (2013) Development and biochemical characterization of EGFR/c-Met dual inhibitors. *Acta pharmaceutica Hungarica* 83(4), 121-33.

További publikációk:

4. Margita Márton, Nikolett Tihanyi, Pál Gyulavári, Gábor Bánhegyi, Orsolya Kapuy (2018) NRF2-regulated cell cycle arrest at early stage of oxidative stress response mechanism. *PLoS One* 13(11), e0207949
DOI: 10.1371/journal.pone.0207949
IF: 2,766

5. István Szabadkai, Robert Torka, Rita Garamvölgyi, Ferenc Baska, Pál Gyulavári, Sándor Boros, Eszter Illyes, Axel Choidas, Axel Ullrich and László Örfi (2018) Discovery of N-[4-(Quinolin-4-yloxy)phenyl]benzenesulfonamides as Novel AXL Kinase Inhibitors. *Journal of Medicinal Chemistry* 61(14), 6277-6292.
DOI: 10.1021/acs.jmedchem.8b00672.
IF: 6,253

6. József Murányi, Attila Varga, Bianka Gurbi, Pál Gyulavári, Gábor Mező, Tibor Vántus (2017) In Vitro Imaging and Quantification of the Drug Targeting Efficiency of Fluorescently Labeled GnRH Analogues. *Journal of Visualized Experiments* 121 Paper: e55529.
DOI: 10.3791/55529.
IF: 1,184

7. József Murányi, Pál Gyulavári, Attila Varga, Györgyi Bökönyi, Henriette Tanai, Tibor Vántus, Domonkos Pap, Krisztina Ludányi, Gábor Mező and György Kéri (2016) Synthesis, characterization and systematic comparison of FITC-labelled GNRH-I, -II and -III analogues on various tumour cells. *Journal of Peptide Science* 22(8), 552-60.
DOI 10.1002/psc.2904
IF: 1,972

8. Attila Varga, Pál Gyulavári, Zoltán Greff, Krisztina Futosi, Tamás Németh, Laura Simon-Szabó, Krisztina Kerekes, Csaba Szántai-Kis, Diána Brauswetter, Márton Kokas, Gábor Borbély, Anna Erdei, Attila Mócsai, György Kéri, Tibor Vántus (2015) Targeting vascular endothelial growth factor receptor 2 and protein kinase D1 related pathways by a multiple kinase inhibitor in angiogenesis and inflammation related processes *in vitro*. *PLoS One* 10(4), e0124234.

DOI: 10.1371/journal.pone.0124234.

IF: 3,057